

四君子汤含药血清上调 c-Myc 表达促进 小肠上皮细胞迁移和增殖

宋厚盼¹, 李如意^{1,2}, 魏艳霞¹, 李鑫¹, 余黄合², 袁振仪³,
蔡雄^{1,3}, 黄惠勇^{1*}, 刘翠玲^{4*}

(1. 湖南中医药大学 中医诊断学湖南省重点实验室, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学 药学院, 长沙 410208; 3. 湖南中医药大学 中医方证研究转化医学湖南省高校重点实验室, 长沙 410208; 4. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 考察四君子汤含药血清(SJZ)对小肠上皮(IEC-6)细胞损伤后迁移、增殖及 c-核蛋白类基因(c-Myc) mRNA 和蛋白表达的影响, 以探讨四君子汤促进胃肠黏膜损伤修复的作用机制。方法: 采用大鼠制备四君子汤含药血清, Tips 划痕法建立 IEC-6 细胞迁移模型, 观察四君子汤药物血清对细胞迁移的影响; 实时细胞分析仪(RTCA)检测四君子汤含药血清对 IEC-6 细胞增殖的影响; 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)法检测 c-Myc mRNA 表达; 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测 c-Myc 蛋白表达。结果: 中体积浓度(10%)和高体积浓度(20%)的四君子汤含药血清可促进 IEC-6 细胞迁移($P < 0.01$); 细胞损伤后 12 h, 中体积浓度(10%)和高体积浓度(20%)的四君子汤含药血清可促进 IEC-6 细胞增殖($P < 0.01$); 细胞损伤后 24 h 和 36 h, 低(5%), 中(10%), 高(20%)体积浓度的四君子汤含药血清均可促进 IEC-6 细胞增殖($P < 0.05$, $P < 0.01$); 进一步研究发现, 中体积浓度(10%)和高体积浓度(20%)的四君子汤含药血清可提高与胃肠黏膜损伤修复密切相关的 c-Myc mRNA 和蛋白表达($P < 0.01$)。结论: 四君子汤修复胃肠黏膜屏障损伤, 促进溃疡愈合的作用可能与其提高 c-Myc mRNA 和蛋白表达, 促进黏膜上皮细胞的迁移和增殖有关。

[关键词] 四君子汤; 胃肠黏膜损伤; 细胞迁移; 细胞增殖; c-核蛋白类基因

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0154-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016220154

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1039.016.html>

[网络出版时间] 2016-09-19 10:39

Effect of Sijunzi Tang in Promoting Migration and Proliferation of Small Intestinal Epithelial Cells by Up-Regulating c-Myc Expression

SONG Hou-pan¹, LI Ru-yi^{1,2}, WEI Yan-xia¹, LI Xin¹, YU Huang-he²,
YUAN Zhen-yi³, CAI Xiong^{1,3}, HUANG Hui-yong^{1*}, LIU Cui-ling^{4*}

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Diagnostics of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3. Hunan Key Laboratory of Translational Medicine Based on Traditional Chinese Medicine Recipe and Syndrome Research in Universities, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 4. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[收稿日期] 20160115(012)

[基金项目] 湖南省科技重大专项(2014FJ1007); 湖南省教育厅优秀青年项目(15B179); 湖南中医药大学博士科研启动项目(1001-017); 湖南中医药大学方剂学省级重点学科开放基金项目(2015-02); 湖南中医药大学中西医诊断学国家重点学科开放基金项目(2015ZYD19)

[第一作者] 宋厚盼, 博士, 讲师, 从事脾胃病证研究, Tel: 0731-85381146, E-mail: pansy-2008@163.com

[通讯作者] * 黄惠勇, 博士, 教授, 从事中医病证诊断规范及信息处理研究, Tel: 0731-85381149, E-mail: huanghy@hnctcm.edu.cn;

* 刘翠玲, 博士后, 助理研究员, 从事中药药理及药性理论研究, Tel: 010-64014411, E-mail: liucuilong0912@163.com

[Abstract] Objective: To study the effect of Sijunzi Tang (SJZT) -containing serum on cell migration and proliferation, c-Myc mRNA and protein expression of injured intestinal epithelial (IEC-6) cell, so as to explore the mechanism of SJZT in promoting gastrointestinal mucosal injury repair. **Method:** Rats were selected to prepare SJZT-containing serum, and IEC-6 cell migration model was established by tips scratch method, so as to observe the effect of SJZT on cell migration. Real-time cell analyzer (RTCA) was used to determine the effect of SJZT-containing serum on IEC-6 cell proliferation, c-Myc mRNA and protein expressions were detected by Real-time PCR and Western blot analysis, respectively. **Result:** The 10% and 20% SJZT-containing serum stimulated IEC-6 cell migration 8 h after cell damage ($P < 0.01$); 10% and 20% SJZT-containing serum increased IEC-6 cell proliferation 12 h after cell damage ($P < 0.01$). 5%, 10%, and 20% SJZT-containing serum enhanced IEC-6 proliferation both at 24, 36 h after damage ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Further studies showed that, 10% and 20% SJZT-containing serum increased c-Myc mRNA and protein expressions that were closely correlated with gastrointestinal mucosal injury repair ($P < 0.01$). **Conclusion:** Sijunzi Tang-containing serum can repair the injury of gastrointestinal mucosal barrier, the mechanism may be related to its effect in improving mucosal c-Myc mRNA and protein expressions and promoting IEC-6 cell migration and proliferation.

[Key words] Sijunzi Tang; gastrointestinal mucosa injury; cell migration; cell proliferation; c-Myc

人体消化道黏膜表面由许多功能各异的上皮细胞组成,胃肠黏膜上皮屏障完整性的破坏通常可诱发各种胃肠道综合征,如急慢性胃炎、十二指肠溃疡、炎症性肠病、功能性肠病等。因此,病理损伤后的黏膜表面屏障修复过程对维持机体正常稳态至关重要。研究表明,胃肠黏膜损伤后其表面上皮完整性的重建至少需通过两种机制完成。首先,受损区域附近的上皮细胞形成伪足样结构,重组细胞骨架,迁移至损伤区域并覆盖裸露部位。第二,上皮细胞通过周期性有丝分裂的方式进行增殖,以迅速补充损伤区域因凋亡脱落的细胞^[1]。c-核蛋白类基因(c-Myc)广泛分布于胃肠道黏膜组织,c-Myc 基因及其产物 c-Myc 蛋白可促进上皮细胞迁移、增殖及分化,并可抑制黏膜损伤后上皮细胞凋亡,对维持胃肠黏膜屏障完整性至关重要^[2]。

四君子汤源于《太平惠民和剂局方》,由人参、白术、茯苓和炙甘草 4 味中药组成,主治脾胃气虚证,是益气健脾治法的基础方和临床常用方。国内外研究发现,四君子汤具有抗胃肠黏膜损伤、调节胃肠活动、促进消化吸收、调节脱氧核糖核酸合成、调节胃肠激素分泌等药理作用^[3]。临床常以此方加减配伍用于功能性消化不良、消化性溃疡、溃疡性结肠炎、贫血以及肝病的治疗^[3]。

本研究通过考察益气健脾基础方四君子汤对损伤的 IEC-6 细胞迁移、增殖及 c-Myc mRNA 和蛋白表达的影响,以探讨四君子汤修复胃肠黏膜损伤、促进溃疡愈合的作用机制。

1 材料

健康 SD 大鼠 12 只,雌性,体重(200 ± 20)g,用于含药血清的制备,由湖南中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(湘)2013-0009。本研究获得湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号 HN-KY-GZR-2013002),所有实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

小肠黏膜上皮(IEC-6)细胞(ATCC,批号 58621209)。经形态学和免疫学鉴定,具有未分化、非致瘤性的特征。

EGF(批号 3129CY10,美国 peprotech 公司);高糖 DMEM 培养基(批号 8161466),胎牛血清(批号 1086422),青霉素-链霉素(批号 1238213),磷酸盐缓冲液(PBS,批号 8112036),TrypLE Express(批号 1045846)均购自美国 Invitrogen 公司;RNAiso Plus reagent(批号 A7603),PrimeScript RT Master Mix(批号 AK2301),SYBR Premix Ex Taq II(批号 AK2901)均购自日本 Takara 公司;小鼠来源单克隆 β -actin 一抗(批号 GR103272-1),小鼠来源单克隆 c-Myc 一抗(批号 GR202136-2),山羊抗小鼠多克隆 HRP 标记二抗(批号 GR142105-1)均购自英国 Abcam 公司;Protein Standards(批号 161-0375),ECL substrate(批号 170-5060)均购自美国 BIO-RAD 公司;SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒(批号 P0012A),SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(批号 P5015),RIPA 裂解液(批号 P0013B),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0010)均购自碧云天生物技术公司。

IX-71 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公

司);8000 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo scientific 公司);Smart Spec plus 型核酸蛋白测定仪,PowerPac Universal 型电泳仪,ChemiDoc XRS⁺ 型成像仪,CFX-96 型荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司);Mastercycler nexus X1 型梯度 PCR 仪,5417R 型高速冷冻小型离心机(德国 Eppendorf 公司);xCELLigence RTCA DP 型实时细胞分析仪,E-Plate 16 型金属板(瑞士 Roche 公司)。

2 方法

2.1 四君子汤含药血清的制备 四君子汤由人参 9 g,白术 9 g,茯苓 9 g,甘草 6 g 组成(参考全国中医药行业高等教育“十二五”规划李冀主编《方剂学》教材)。四君子汤组方药材购于湖南中医药大学第一附属医院,经湖南中医药大学中药鉴定教研室刘塔斯教授鉴定,人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根茎,白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* 的干燥根茎,茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* 的干燥菌核,甘草为豆科植物 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根茎。常规方法煎煮 2 次,合并药液,浓缩至每毫升含生药 2 g。参考文献[4-5],将 SD 大鼠随机分为空白组与四君子汤组(含生药 13.75 g·kg⁻¹),每组各 6 只。每天灌胃 2 次,连续 3 d,空白组灌胃同体积生理盐水,第 4 天 1 次服用全天剂量,2 h 后乙醚麻醉,腹主动脉采血,分离血清,将同组血清混匀,56 °C 灭活 30 min,以 0.45 μm 微孔滤膜过滤,分装,得四君子汤含药血清。以常规培养血清(胎牛血清)将空白组血清稀释成 10% 质量分数,将四君子汤含药血清分别稀释成 5% (低质量分数),10% (中质量分数)和 20% (高质量分数)^[5]。-20 °C 低温冰箱保存备用。

2.2 细胞培养与细胞迁移测定方法^[6-7] 用红色标记笔在六孔板底部画 5 条直线,便于准确选取拍照位置。细胞以 4 × 10⁵ 个/mL 密度接种于六孔板,每孔培养液 2.5 mL;36 h 后吸弃培养液,用 1 000 μL 移液枪头(Tips)以 45 度角沿各孔直径轻轻划一条痕(划痕与底部标记线垂直)。PBS 清洗细胞表面 2 次以去除漂浮的细胞残骸和代谢产物。加入空白血清,EGF(30 μg·L⁻¹)及不同质量分数的四君子汤含药血清(20%,10%,5%)培养 8 h,显微镜拍照记录划痕和标记线交叉部位面积。NIH Image 软件(版本 1.58)测量划痕面积,IEC-6 细胞迁移率等于 (S₀ - S₈)/S₀(S₀,0 h 划痕面积;S₈,培养 8 h 后划痕面积)。每组 2 个复孔,重复 2 次实验。

2.3 RTCA(实时细胞分析仪)检测 IEC-6 细胞增殖

往 E-plate 板各孔加入密度为 1 × 10⁵ 个/mL 的 IEC-6 细胞混悬液 100 μL,将 E-plate 板安置于 RTCA 上,平衡各孔电阻值。取下 E-plate 板,往各孔再加入密度为 1 × 10⁵ 个/mL 的 IEC-6 细胞混悬液 100 μL,室温静置 30 min 后将其连接于 RTCA。设置参数每隔 30 min 记录 1 次,连续记录 200 次。23 h 后,暂停 RTCA,取出 E-plate 板,从每孔吸弃 100 μL 培养液,空白组再加入含空白血清的新鲜培养液 100 μL,其余各组则再加入含受试药(EGF,四君子汤含药血清)的培养液 100 μL。将 E-plate 板重新安装于 RTCA,运行,记录 IEC-6 细胞生长曲线。每组 3 个复孔,重复 2 次实验。

2.4 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)法检测 c-Myc mRNA 表达 IEC-6 细胞以 1 × 10⁶ 个/孔接种于六孔板,贴壁培养 36 h 后进行 Tips 划痕,加入空白血清,EGF(30 μg·L⁻¹)及不同质量分数的四君子汤含药血清(20%,10%,5%)继续培养 24 h,以 RNAiso Plus reagent 提取各组细胞总 RNA,并立即检测 RNA 纯度和完整性。采用 PrimeScript RT Master Mix 试剂将 RNA 逆转录为 cDNA,逆转录条件为 37 °C 15 min,85 °C 5 s。接着采用 SYBR Premix Ex Taq II 进行荧光定量 PCR 反应,反应条件为 95 °C 30 s,90 °C 5 s,60 °C 30 s,25 μL 反应体系,连续进行 40 个循环。以 β-actin 为内参基因,采用 2^{-ΔΔCt} 法对 c-Myc 表达进行相对定量。Real-time PCR 反应的引物序列为 β-actin(150 bp)上游 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3',下游 5'-TTGG CCTTGGGGTTCAGGGG-3';c-Myc(160 bp)上游 5'-AAACTAGTGAGCTCGCCCAAGTCCTG-3',下游 5'-GGA-AGCTTAGAGAAGGCGCTGGAG-3'。每组 3 个复孔,重复 2 次实验。

2.5 蛋白免疫印迹(Western blot)检测 c-Myc 蛋白表达 IEC-6 细胞以 1 × 10⁶ 个/孔接种于六孔板,贴壁培养 36 h,Tips 划痕建立损伤模型,加入空白血清,EGF(30 μg·L⁻¹)及不同质量分数的四君子汤含药血清(20%,10%,5%)培养 24 h 后采用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度,制备 Western blot 上样样品,接着进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后恒流 200 mA 转膜 90 min。根据 Protein Standards 精确裁剪 PVDF 膜并将其置于含 5% BSA 的 TBST 中封闭 1 h。分别采用小鼠来源单克隆 β-actin(1:2 000)和 c-Myc(1:10 000)一抗 4 °C 孵育过夜,洗膜,加入山羊抗小鼠多克隆 HRP 标记二抗(1:5 000)室温孵育 2 h,将 PVDF 膜置于 ECL 发光

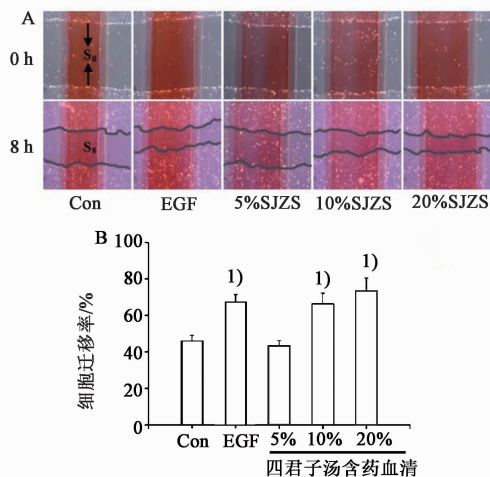
液反应 5 min, 通过 ChemiDoc XR⁺ 检测蛋白表达情况, 采用 Image Lab 软件对蛋白表达进行相对定量分析。每组 3 个复孔。

2.6 统计学方法 应用 SPSS 19.0 统计软件分析, 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 先进行方差齐性检验, 然后进行单因素方差分析, 采用 LSD/Dunnett 法进行组间比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 四君子汤含药血清对 IEC-6 细胞迁移的影响

胃肠黏膜损伤重建的第一个步骤为上皮细胞迁移, 该过程一般开始于损伤后几分钟至几小时不等^[8]。本研究采用 Tips 划痕法建立 IEC-6 细胞损伤迁移模型, 结果如图 1 所示。空白组 (Con) 细胞迁移率为 45.82%, EGF 组细胞迁移率为 67.61%, 明显高于空白组 ($P < 0.01$)。低体积浓度 (5%) 的四君子汤含药血清 (SJZS) 不能加速 IEC-6 细胞迁移, 迁移率仅为 43.67%, 中 (10%), 高 (20%) 组细胞迁移率分别为 66.33% 和 73.52%, 均明显高于空白组 ($P < 0.01$), 提示四君子汤可加速胃肠黏膜损伤修复的细胞迁移过程。



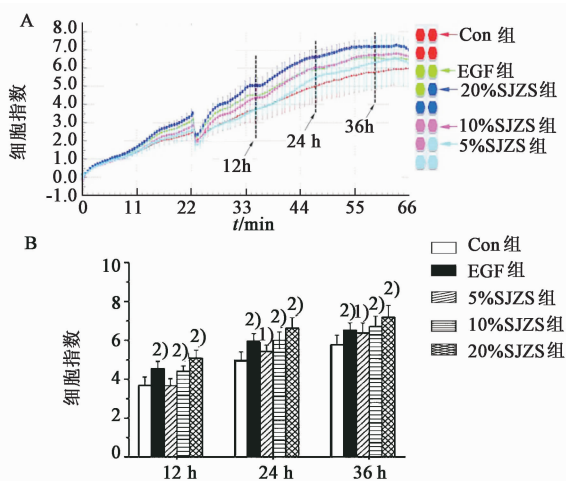
A. Tips 划痕法建立 IEC-6 细胞迁移模型, 给予受试药 8 h 后, 各组细胞迁移图片; B. 定量统计各组的细胞迁移率与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$

图 1 四君子汤含药血清对 IEC-6 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 1 Effect of Sijunzi Tang-containing serum on IEC-6 cell migration ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 四君子汤含药血清对 IEC-6 细胞增殖的作用

胃肠黏膜损伤修复的第二个步骤为上皮细胞增殖, 该过程一般发生在损伤 12 h 以后^[8]。本研究采用实时细胞分析仪 (RTCA) 检测四君子汤含药血清对 IEC-6 细胞增殖的作用。RTCA 是应用电子阻抗技术的实时细胞电感应仪, 它可检测贴壁细胞贴附

于培养板电极电阻的变化, 将电阻值转换成细胞指数 (Cell Index), 以反映细胞增殖的情况^[9]。图 2 结果显示, 给予受试药 12 h 后, 四君子汤含药血清 (SJZS) 中 (10%), 高 (20%) 组细胞指数分别为 (4.41 ± 0.27), (5.08 ± 0.42), 显著高于空白组 (Con) 细胞指数 (3.68 ± 0.43) ($P < 0.01$); 给予受试药 24 h 和 36 h 后, 四君子汤含药血清低 (5%), 中 (10%), 高 (20%) 体积浓度组细胞指数均显著高于空白组细胞指数 ($P < 0.05, P < 0.01$), 提示四君子汤可促进胃肠黏膜损伤修复的细胞增殖过程。



A. RTCA 检测 IEC-6 细胞增殖情况; B. 定量统计细胞指数以反映细胞增殖效果; 与各时间段空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

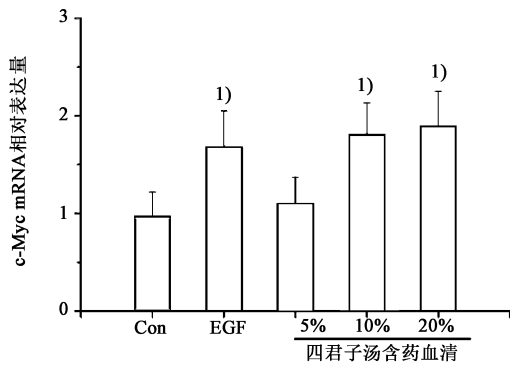
图 2 四君子汤含药血清对 IEC-6 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 2 Effect of Sijunzi Tang-containing serum on IEC-6 cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 四君子汤含药血清对 c-Myc mRNA 表达的影响

c-Myc 广泛分布于胃肠黏膜组织, 通过促进黏膜上皮细胞迁移和增殖, 抑制上皮细胞凋亡, 对维持胃肠黏膜屏障完整具有重要作用^[2]。本实验考察四君子汤含药血清 (SJZS) 对 c-Myc mRNA 表达的影响。图 3 结果显示, 与空白组 (Con) 比较, 四君子汤含药血清中 (10%), 高 (20%) 组体积浓度均显著提高了 c-Myc mRNA 表达 ($P < 0.01$), 从基因表达的水平初步揭示了四君子汤促进 IEC-6 细胞迁移和增殖的作用机制。

3.4 四君子汤含药血清对 c-Myc 蛋白表达的影响

与 c-Myc mRNA 表达情况相似, 四君子汤含药血清 (SJZS) 中 (10%), 高 (20%) 组体积浓度也显著提高了 c-Myc 蛋白表达, 如图 4 所示, 加入 10% 和 20% 体积浓度的四君子汤含药血清后, c-Myc 蛋白相对表达量分别为 (1.38 ± 0.29) 和 (1.43 ± 0.32), 与空白组 (Con) c-Myc 蛋白相对表达量 ($0.81 \pm$



与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ (图 4 同)

图 3 四君子汤含药血清对 c-Myc mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of Sijunzi Tang-containing serum on c-Myc mRNA expression ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

0.12) 相比, $P < 0.01$, 从蛋白表达的水平初步揭示了四君子汤促进 IEC-6 细胞迁移和增殖的作用机制。

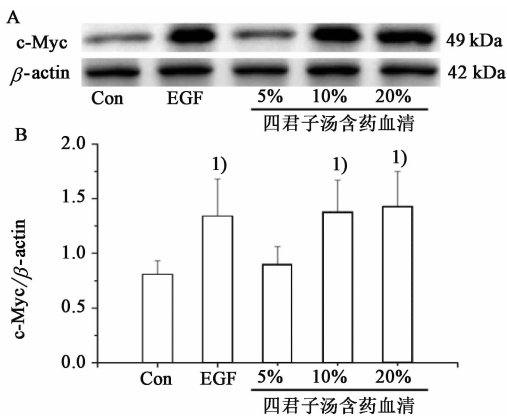


图 4 四君子汤含药血清对 c-Myc 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Sijunzi Tang-containing serum on c-Myc protein expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

脾居中焦,主运化,为气血生化之源,后天之本。胃肠道不仅是一个传输、消化和吸收营养物质的器官,胃肠黏膜紧密排列的上皮细胞层还是一道分隔内外环境,维持黏膜内外酸碱平衡,阻止胃蛋白酶通透,保护机体免受细菌、毒素等有害物质侵袭的内在屏障。因此,胃肠黏膜屏障的完整性是维持胃肠功能的重要基础,是“脾主运化”的重要保证^[10]。

现有的研究资料表明,胃肠黏膜损伤机制与中医脾气虚病理改变密切相关,益气健脾法是中医临床治疗消化道黏膜病变的常用治法之一^[10]。维持消化道黏膜屏障完整性是黏膜上皮细胞迁移、增殖(凋亡)、成熟分化等过程共同作用的结果。小肠黏膜上皮 IEC-6 细胞株来源于大鼠小肠隐窝,经形态

学和免疫学鉴定,具有未分化、非致瘤性的特征,现普遍将其应用于体外建立胃肠黏膜损伤模型^[11]。本研究团队前期的实验发现,四君子汤的组方药物白术可促进 IEC-6 细胞迁移,其机制与影响细胞内多胺介导的信号通路有关^[6-7]。另有研究显示,四君子汤的组成药物甘草可使细胞内的 RNA 结合蛋白 HuR 聚集,从而降低 p21 mRNA 表达,通过转录后水平的调节促进 IEC-6 细胞迁移^[12]。药有个性之专长,方有合群之妙用,方剂是临床用药的主要形式。本论文延续前期的工作基础,在分子水平继续探究益气健脾基础方剂四君子汤(人参、白术、甘草、茯苓)对胃肠黏膜损伤修复的综合调节效应。

c-Myc 是 Myc 基因家族中重要的一员,属于核蛋白类调控基因。c-Myc 蛋白含有 α -螺旋区域和富含酸性及碱性氨基酸的独立区,并可通过自身的复合位点被酪蛋白激酶 II (CK II) 磷酸化,c-Myc 结构的独特性使其作为转录因子参与调控机体大多数组织细胞的生长通路(迁移、增殖、分化)。研究发现,在 IEC-6 细胞损伤修复过程中,细胞内多胺通过 Chk2 增加 RNA 结合蛋白 HuR 磷酸化,从而加强 HuR 与 c-Myc mRNA 3'端非编码区的联系,反过来促进 c-Myc 翻译,从而促进 IEC-6 细胞迁移和增殖^[13]。新近研究表明, RNA 结合蛋白 CELF1 与 HuR 竞争调节 c-Myc 翻译以调控肠黏膜上皮生长与凋亡的平衡。CELF1 通过降低 c-Myc mRNA 与 HuR 结合抑制 c-Myc 翻译,从而抑制 IEC-6 细胞迁移及增殖,延缓黏膜损伤修复过程^[14]。本研究采用 Tips 划痕法和 RTCA 分别检测了四君子汤含药血清对损伤 IEC-6 细胞迁移和增殖的作用,结果发现四君子汤含药血清可明显促进 IEC-6 细胞迁移和增殖。分子水平的实验发现,四君子汤含药血清显著提高了 c-Myc mRNA 和蛋白表达。这些实验结果提示,四君子汤具有促进胃肠黏膜损伤修复的功能。

本研究考察益气健脾方剂四君子汤对损伤黏膜上皮细胞迁移和增殖的作用效果及机制,为解释中医脾气虚证在胃肠黏膜屏障损伤机制中的发病意义提供了实验依据。值得一提的是,体外黏膜环境与体内黏膜环境存在差异,体外黏膜上皮细胞生长不能完全反映体内黏膜损伤修复情况,以四君子汤为代表的益气健脾类方剂能否改善体内黏膜病理损伤,恢复黏膜血流量、黏膜通透性等功能性指标,从而治疗溃疡性疾病,是本实验团队下一阶段研究的问题。

[参考文献]

- [1] Kemmerly T, Kaunitz J D. Gastroduodenal mucosal defense [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2013, 29(6): 642-649.
- [2] Kim W, Kim M, Jho E H. Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus [J]. *Biochem J*, 2013, 450(1): 9-21.
- [3] 吕苑. 四君子汤的药理研究和临床应用 [J]. *中医研究*, 2012, 25(1): 76-79.
- [4] 孟李,王宁生. 含药血清的制备方法研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 1999, 10(5): 290-292.
- [5] 黄臣虎,陆茵,高骁君,等. 中药血清药理学研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(10): 266-271.
- [6] 宋厚盼,谢梦洲,胡志希,等. 白术、黄芪、党参促进 IEC-6 细胞损伤后的快速修复 [J]. *中成药*, 2015, 37(6): 1170-1175.
- [7] 宋厚盼,李茹柳,王一寓,等. 白术提取物对 IEC-6 细胞迁移过程多胺信号通路钙离子调控的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(5): 1361-1367.
- [8] Iizuka M, Konno S. Wound healing of intestinal epithelial cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(17): 2161-2171.
- [9] Rakers S, Imse F, Gebert M. Real-time cell analysis; sensitivity of different vertebrate cell cultures to copper sulfate measured by xCELLigence (R) [J]. *Ecotoxicology*, 2014, 23(8): 1582-1591.
- [10] 施甜,朱方石,徐婷婷. 脾虚与胃黏膜损伤相关性的理论探讨 [J]. *医学与哲学*, 2011, 32(12): 59-60.
- [11] Rao J N, Rathor N, Zhuang R, et al. Polyamines regulate intestinal epithelial restitution through TRPC1-mediated Ca^{2+} signaling by differentially modulating STIM1 and STIM2 [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 303(3): C308-317.
- [12] He Y, Zhang X, Zeng X, et al. HuR-mediated posttranscriptional regulation of p21 is involved in the effect of glycyrrhiza uralensis licorice aqueous extract on polyamine-depleted intestinal crypt cells proliferation [J]. *J Nut Biochem*, 2012, 23(10): 1285-1293.
- [13] Liu L, Rao J N, Zou T, et al. Polyamines regulate c-Myc translation through Chk2-dependent HuR phosphorylation [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(23): 4885-4898.
- [14] Liu L, Ouyang M, Rao J N, et al. Competition between RNA-binding proteins CELF1 and HuR modulates MYC translation and intestinal epithelium renewal [J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(10): 1797-1810.

[责任编辑 邹晓翠]